Е.В. Никиткина
ГНУ ВНИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОВРЕЖДЕНИЙ СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКОВ И ЖЕРЕБЦОВ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Долговременное хранение глубокозамороженной спермы производителей является самым дешевым и надежным способом сохранения и эффективного использования генофонда популяции. Несмотря на достигнутые успехи, проблема совершенствования методов оценки, длительного хранения и криоконсервации спермы животных все еще остается актуальной.

В связи с этим проводили оценку сперматозоидов быков и жеребцов до и после криоконсервации фазово-контрастной микроскопией и флуоресцентным методом с использованием ядерного красителя этидиум бромида.

Свежеполученная сперма быков и жеребцов различается по объему и концентрации сперматозоидов. У быков объем эякулята 2-10 мл, у жеребца 40-100 мл, концентрация клеток у быков 0,6-2,0 млрд/мл, у жеребцов 0,1-0,8 млрд/мл. Также различается и устойчивость сперматозоидов быков и жеребцов к низкотемпературным воздействиям.

Из данных таблицы 1 видно, что уже в свежеполученной сперме жеребцов наблюдается в 2 раза большее количество сперматозоидов с поврежденной акросомой, чем в сперме быков. Наибольшие повреждения в нативной сперме жеребцов были в области шейки и хвоста сперматозоидов. В то время как в свежеполученной сперме быков большого количества повреждений клеток не наблюдалось.

При замораживании оттаивании существенных повреждений акросом сперматозоидов жеребца в отличие от быков не происходило. А доля клеток с поврежденным хвостом и шейкой возросла почти в 2 раза. Это показывает, что шейный и хвостовой отделы сперматозоидов жеребца, где сосредоточены митохондрии и фибриллярные структуры, являются более чувствительными к действию охлаждения и замораживания-оттаивания, чем у сперматозоидов быков.

Данные оценки проницаемости мембран сперматозоидов флуоресцентным методом согласуются с результатами фазово-контрастной микроскопии. Как видно из таблицы 2 нарушения проницаемости мембран значительной части сперматозоидов жеребцов наблюдаются уже в свежеполученной сперме, что по-видимому связано с повреждениями шейного отдела клеток. После криоконсервации количество повреждений мембран в сперме быков и жеребцов находятся приблизительно на одном уровне.

Таким образом, можно предположить, что у сперматозоидов быков более чувствителен к действию низких температур акросомный отдел. А у сперматозоидов жеребцов шейный и хвостовой отделы, где сосредоточены митохондрии и фибриллярные структуры

Таблица 2
Влияние замораживания-оттаивания на проницаемость мембран сперматозоидов жеребцов и быков

	Сперма	Нарушение проницаемости мембран, %
жеребцы	Нативная	45,1±2,22
	Оттаянная	57,0±2,63
быки	Нативная	17,5±2,2
	Оттаянная	59,8±2,0

Таблица 1
Влияние замораживания-оттаивания на морфологические показатели спермы жеребцов и быков

	Сперма	Повреждено, %			
		Акросомы	Хвосты и шейки	Форма головки	Прочие
Жеребцы	Нативная	10,5±1,13	17,4±1,48	0,8±0,01	4,9±0,51
	Оттаянная	13,3±0,91	29,6±2,56	0,8±0,01	5,3±0,8
быки	Нативная	5,0±0,9	2,8±0,7	0,65±0,1	0,8±0,01
	Оттаянная	19,1±0,9	4,6±0,6	1,1±0,1	2,9±0,7

SUMMARY
Influence of freezing on bovin and equine sperm was studied. Is was established, that the most sensitive parts to low temperatures in bovin sperm are acrosomes.And in equine sperm the most sensitive parts to low temperatures are necks and tails.

УДК: 575. 224:599.323.4

Н.Ю. Сахарова, Л.М. Межевикина, Е.Ф. Вихлянцева, Т.В. Суханова, А.А. Смирнов, М.М. Поцелуева, В.С. Шубина, А.М. Малашенко
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институт биофизики клетки РАН, Пущинский Государственный Университет, Научный центр биомедицинской технологии РАМН

ВЛИЯНИЕ ДМСО НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЗАРОДЫШЕЙ МУТАНТНЫХ МЫШЕЙ KIT^{W-Y} В УСЛОВИЯХ IN VITRO И ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Мутация Dominant spotting (Kit^{W}) наиболее полно изучена на мышах, для которых известно более 70 ее аллелей. Большинство аллелей приводят к гибели гомозиготных особей. Гетерозиготные животные жизнеспособны, но у них изменена окраска шерсти, нарушены кроветворение и гаметогенез [1]. Фенотипические проявления мутации Kit^{W} у мышей связаны с нарушениями строения гена *c-kit*, расположенного в 5 хромосоме и кодирующего рецепторную тирозинкиназу [2, 3].

Одним из аллелей мутации Kit^{W}является аллель Kit^{W-Y}, обнаруженный у мышей линии C57BL/6 JY [4]. Изучение Kit^{W-Y} в гаметогенезе и в эмбриогенезе выявило частичный блок сперматогенеза на стадии диплотены, негативное влияние на дифференцировку мужских половых клеток, увеличение гибели яйцеклеток и эмбрионов на ранних стадиях развития [5]. Нарушения фертильности у мышей, несущих мутацию Kit^{W-Y}, делает их удобными моделями как для изучения механизмов регуляции внутриклеточных сигнальных процессов с использованием тирозинкиназных рецепторов, так и для изучения молекулярной генетики, биологии развития и репродукции млекопитающих [6]. Все это свидетельствует о необходимости сохранения гетерозиготных мышей Kit^{W-Y} для современных медико-биологических исследований, в том числе путем консервации их зародышей в генетических криобанках при температуре жидкого азота.

Процедура криоконсервации предусматривает работу с изолированными зародышами, а также использование специальных сред и криозащитных агентов, необходимых для поддержания сохранности объектов в жидком азоте и на этапе восстановления после размораживания. Целью наших исследований была оценка выживаемости мутантных зародышей мыши после криоконсервации и при действии криопротектора ДМСО. Культивирование и замораживание в жидком азоте проводили в стандартных условиях [7, 8].

В первой серии опытов было показано, что 2-клеточные зародыши, полученные от скрещивания гетерозиготных мышей B6 +/Kit^{W-Y} имеют более низкий потенциал

Таблица 1

Выживаемость 2-клеточных зародышей линии B6 с диким или мутантным геном Kit^{W-Y} после криоконсервации

Характеристики	B6 +/+		B6 +/Kit^{W-Y}	
	in vitro	-196° С	*in vitro*	-196° С
Количество зародышей	67	64	90	41
% развившихся до стадии бластоцисты	67,3*	60,9**	38,8*	45,4**

Примечание. В качестве криопротектора использовали 10% ДМСО (Sigma).
* , ** - различия между двумя группами сравнения достоверны (P<0,01)